J 28

Jec

Ricordo
di C Zenoni

Istituto Sieroterapico Milanese

INFLUENZA
DELLA
TOSSINA DIFTERICA
SULLA VITA
DELLA MADRE e DEL FETO

per il

Dott. C. ZENONI

Docente di Anatomia patologica

MILANO

CASA EDITRICE DOTTOR FRANCESCO VALLARDI

CORSO MAGENTA 48.

Estratto dalla *Gazzetta degli Ospedali e delle Cliniche*
N. 24. Anno 1902

Stabilimento dell'Antica Casa Editrice Dottor FRANCESCO VALLARDI
Milano, Corso Magenta N. 48.

L'azione della tossina difterica, già studiata in vivo per molte altre condizioni dell'organismo, presenta durante la gravidanza alcune particolarità riguardo alla resistenza della madre e del feto, le quali si connettono con l'importante questione del passaggio delle tossine nelle infezioni endouterine e con quella del meccanismo dell'immunità nella gravidanza.

Da ricerche che ho istituite sopra 16 cavie, scelte tutte di egual peso (450-500 grammi) e inoculate sotto la cute dell'addome con cmc. 0,1 di tossina difterica, ho veduto verificarsi questo fatto, che, mentre le cavie maschi e le femmine non gravide soccombevano già dopo 24 ore dall'inoculazione, quelle gravide invece quasi tutte sopravvivevano alla stessa dose mortale di tossina iniettata.

L'esistenza della gravidanza veniva ogni volta rilevata prima dell'esperimento mediante ispezione e palpazione dell'addome e mediante l'esame del sangue riguardo alla leucocitosi gravidica. In seguito essa veniva accertata o allo avvento del parto o sacrificando gli animali superstiti parecchi giorni dopo che avevano superato l'intossicazione.

Per tutte le altre cavie non gravide che soccombevano alla iniezione di tossina difterica ho sempre praticato l'autopsia allo scopo di riconoscere le alterazioni anatomo-patologiche determinate dalla tossina difterica, e per potere escludere la possibilità di una gravidanza non anteriormente riconosciuta.

Operando questo controllo ebbi opportunità di ottenere la controprova della prevalente resistenza delle cavie gravide alla tossina difterica, pel fatto che due cavie diagnosticate gravide prima di sottoporle all'iniezione di tossina essendo venute a morte in 24-26 ore come quelle che non erano gravide, presentarono alla sezione necroscopica nessuna traccia di gravidanza. In un caso di gravidanza accertata l'animale soccombette del pari, ma erano quivi intervenute verosimilmente altre cause all'infuori dell'intossicazione difterica, quali il trauma del parto provocato e un indebolimento dell'organismo.

Va per altro notato che la dose di tossina difterica da me impiegata in queste ricerche è stata notevolmente forte, poichè la tossina da me preparata proveniva da culture del bacillo di Loeffler altamente tossiche, con le quali ho ottenuto nei cavalli dei sieri antidifterici ad alto valore antitossico (300-400 U. I. in 1 ccm.), e con le stesse ho preparato una tossina testo assai forte, la cui dose mortale relativa (L. +), esattamente titolata secondo il metodo Ehrlich, era di ccm. 0,27 per una cavia del peso di gr. 250. Ho preferito però in questi primi esperimenti attenermi alla dose assoluta elevata di 0,1 ccm. di tossina allo scopo di non andare incontro a risultati incerti circa la resistenza degli animali, sia pel fatto di non infrequenti oscillazioni nel valore limite assoluto e relativo della tossina, sia per differenze individuali e di razza delle cavie. Tanto più attendibili quindi sono i risultati da me osservati nella gravidanza mediante una tossina difterica forte sia sulla madre che sul feto, in confronto di quelli in condizioni normali presentati dagli animali di controllo.

Le cavie gravide che ho sottoposto a iniezione di tossina difterica si trovavano a vari periodi di gravidanza alcune all'ultimo, altre al secondo o al periodo iniziale, come mi riusciva di stabilire ogni volta in base ai dati in lunghezza e in peso dei rispettivi feti. Mediante l'intossicazione difterica provocata nella gestazione ho potuto realizzare più eventualità, varianti dall'aborto all'evoluzione normale. Questa ultima eventualità sembra minore nel periodo affatto iniziale e nell'ultimo che in quello intermedio, poichè ho osservato che alcune cavie nel secondo periodo della gestazione non si sgravarono. Negli altri casi in cui la gravidanza è stata interrotta l'aborto ebbe luogo già poche ore

dopo praticata l'iniezione della tossina (1). Questo è il caso specialmente nelle gravidanze a termine, in cui ho constatato pure che i feti emessi a completa maturanza possono sopravvivere più o meno lungamente.

Ne risulta la possibilità che l'infezione della madre con tossina difterica causi l'aborto senza che il feto dimostri di risentirne; mentre altre volte l'embrione soccombe più tardi con le lesioni tossiche caratteristiche. Così in casi di aborto avvenuto in cavie durante l'ultimo periodo della gravidanza ho potuto osservare nei feti già grossi, quasi a termine, (lunghi 8-10 cm.; del peso di gr. 25-35) il reperto tossico dell'arrossamento spiccato delle capsule surrenali e dei reni. Riguardo però alla presenza di queste lesioni tossiche più o meno manifeste nei feti, gli studii sulle infezioni endouterine insegnano che non sempre il feto viene alla luce con le lesioni caratteristiche, come ad es. nell'ileo-tifo (*Neuhaus*, *Eberth*), in cui generalmente mancano le alterazioni macroscopiche comuni (ipertrofia splenica, ulcerazioni dei follicoli all'intestino, ecc.). Di più può verificarsi che di parecchi feti in una stessa madre non tutti vengono contaminati, per modo che alcuni prodotti del concepimento possono essere sani, altri portare traccia della malattia. Nondimeno il fatto da noi osservato della comparsa di lesioni tossiche in feti maturi, in conseguenza di iniezione di tossina difterica nella madre, concorda con quanto ha fatto rilevare *Latis* (1891) per le infezioni endouterine: l'influenza cioè che esercitano sul passaggio dei germi dalla madre al feto gli ultimi periodi della gravidanza; perchè gli embrioni verso la fine della stessa hanno assai minore resistenza e muoiono più presto.

In altre esperienze in relazione alla immunizzazione antidifterica nella gravidanza sarà interessante di ricercare, se oltre all'influenza della tossina difterica sullo sviluppo dell'embrione siavi fra i prodotti del concepimento una parte vaccinata e un'altra no (2).

(1) Tschistowitsch e Jourewitsch. (Annales de l'Institut Pasteur, n. 10, 1901) in un caso videro una coniglia madre emettere i pericoli un'ora dopo avere ricevuto una iniezione intravenosa di tossina difterica.

(2) È interessante a questo riguardo l'osservazione di Vaillard che i prodotti contemporanei di una stessa madre possono differire tra loro per gradi di immunità.

Tale differenza, del pari che l'immunità relativamente debole della prole di madri immunizzate, avrebbe origine essenzialmente secondo Dzierigowski nell'immunità acquistata con l'uovo nel follicolo di Graf, e in follicoli diversi per provenienza.

Per quanto ora riguarda la resistenza della madre alla tossina difterica riferirò i reperti patologici e anatomici delle cavie inoculate. Subito dopo l'iniezione sottocutanea di tossina si ha un periodo di ipoleucocitosi; indi sopravviene la iperleucocitosi.

Ad accrescere questa iperleucocitosi tossica delle cavie va aggiunta ancora nei casi di aborto e di rapido sgravamento l'iperleucocitosi provocata dall'azione simultanea del travaglio del parto. Inoltre all'insorgere dell'ipertermia l'animale dinota malessere e dolorabilità dell'addome alla pressione.

La reazione locale al punto di innesto della tossina difterica nel cellulare sottocutaneo dell'addome presenta differenze di grado nelle cavie gravide e in quelle non gravide. Mentre in queste ultime già iniettando 0,1 cm. di tossina si ha comparsa di tumefazione, edema e infiltrazione; è invece scarsa e a volte quasi mancante ogni manifestazione nelle cavie gravide. Tale differenza, che risulta confermata anche all'autopsia, non si può spiegare semplicemente per influenze dovute al modo di praticare le inoculazioni più o meno profondamente nel cellulare sottocutaneo.

Non sembra impossibile che sulla comparsa più o meno forte di tumefazione locale agisca in qualche parte lo sviluppo delle glandole mammarie nel decorso della gravidanza, perchè la reazione all'introduzione di tossina difterica nel cellulare sottocutaneo appare più forte per le cavie meno inoltrate nella gravidanza; mentre in quelle più avanzate compare talora soltanto lieve edema emorragico delle ghiandole mammarie.

Anche le lesioni viscerali di origine tossica presentate dalle cavie gravide non sono identiche in tutte le età della gravidanza, presentando talune differenze a seconda che interviene l'aborto o che compiesi l'evoluzione normale. In cavie gravide al 1.° e 2.° stadio sopravvissute, senza interruzione della gravidanza, ho riscontrato che, mentre eravi la milza tumefatta e arrossata, le capsule surrenali erano pallide. Nelle cavie di controllo invece esisteva sempre iperemia intensa tanto della milza che delle capsule surrenali. In stadii più avanzati della gravidanza, in cui l'iniezione di tossina difterica ha avuto per effetto l'aborto senza cagionare la morte della cavia, è mancato l'arrossamento sia delle capsule surrenali che della milza; mentre queste lesioni esistevano quando lo sgravamento era così tumultuoso da non permettere la vita della madre.

Nei casi di mancata conferma necroscopica della gravidanza ricorderò solo come ho ottenuto sempre il reperto anatomico tipico e le lesioni caratteristiche, che ordinariamente determina la tossina difterica virulenta nelle cavie.

Oltre alle differenze già notate circa la reazione locale alla sede della inoculazione della tossina difterica, dobbiamo ancora rilevare che la reazione locale è per lo più spiccata nei casi in cui la gestazione non resta interrotta; mentre quando si effettua l'aborto, si trova generalmente un edema sottocutaneo meno intenso.

Questi risultati, che non stanno in rapporto con una maggiore o minore tossicità della tossina difterica impiegata, dinotano forse qualche azione di difesa localmente esercitata dai tessuti contro la tossina, sia limitandone la diffusione, sia distruggendola parzialmente. Se nelle cavie gravide possa concorrere in questa opera di difesa la ghiandola mammaria funzionante, rispettivamente il secreto di essa (1), non possiamo per ora dire. Risulta però da ciò una prova dell'influenza che la tossina difterica a seconda dell'azione esercitata nell'organismo materno può svolgere indirettamente anche sulla vita del feto. Si potrebbe ora nondimeno pensare che la tossina introdotta nel sistema linfatico sottocutaneo della madre non passi nel sangue della madre stessa, per penetrare quindi in quello del feto. Ma questa spiegazione non appare sufficiente in quei casi di non interrotta gravidanza delle cavie accompagnata da vasto edema sottocutaneo; perchè pur avvenendo la diffusione della tossina nella madre, non arriverebbe a penetrare nel sangue del feto se non ciò che non è stato distrutto o reso inoffensivo nell'organismo materno.

All'affettuarsi di questo passaggio della tossina difterica, come per altre infezioni endouterine, non occorrono alterazioni patologiche (es. emorragie della placenta), ma vi concorre in gran parte il potere tossico della tossina e il tempo in cui questa può soffermarsi nella placenta. Attraverso il filtro placentare le tossine circolanti nel sangue della madre possono ancor più facilmente dei microbi penetrare nel sangue fetale. Questo passaggio è indicato da molti casi conosciuti di malattia o di morte intrauterina di feti, che sopravvengono nel corso di infezioni della madre; e nel nostro caso

(1) Ehrlich ha trovato che il latte racchiude e trasmette le antitossine al poppante.

lo dimostrano pure le lesioni tossiche da noi riscontrate nei feti di alcune cavie sottoposte a intossicazione difterica.

Per contro la mancanza di qualsiasi lesione tossica in feti appartenenti ad altre cavie gravide parimente inoculate con tossina difterica potrebbe significare che le tossine non passano affatto nel feto attraverso la placenta. A questa conclusione troppo prematura è arrivato recentemente *Dzierigowski* (1), basandosi sul fatto che il sangue di feti di cavallo, capra, cane, immunizzato contro la difterite non contiene antitossina. Così pure dalle osservazioni di *Tschistovitsch* e *Jourewitsch* circa l'assenza di modificazioni morfologiche marcate nel sangue fetale al momento stesso in cui nella madre, sotto l'influenza di una infezione, compare l'ipo o l'iperleucocitosi, si potrebbe dedurre che nulla passi nel sangue dei feti nel corso di infezioni endouterine.

Infatti, facendo circolare della tossina difterica nel sangue materno, e praticando il taglio cesareo quando le madri presentano evidente iperleucocitosi, si trova che il numero di globuli bianchi in tutti i feti quasi a termine di cavie intossicate è piccolo quanto quello dei feti normali (da 502 a 1,314 per mmc.). Ben poca differenza risulta nella varietà dei leucociti, prevalendo sempre nei feti i linfociti, che rappresentano nel sangue di feti normali di cavia, secondo *Tschistovitsch* e *Jourewitsch*, il 53 88 % dei leucociti fetali. Anche il numero dei globuli rossi dei feti di cavie intossicate non differisce dal normale; dalla cifra cioè di soli 500,000 nel primo periodo della vita intrauterina cresce progressivamente fino a 3.500.000 (*Cohnstein* e *Zuntz* (2)), oppure 4,500,000 6,200,000 (*Tschistowitsch* e *Jourewitsch* (3)), di cui 100 900 globuli rossi nucleati per mmc.

Quantunque l'esame ematologico non riesca quindi a dimostrare da parte del feto qualsiasi reazione morfologica del sangue, pure abbiamo veduto come i feti delle cavie gravide da noi intossicate vengono sovente colpiti e perfino periscano. Pur concordando tra loro i risultati delle esperienze sul l'animale e quelli sulla donna a dimostrare la permeabilità della placenta alle tossine, non dobbiamo pertanto considerare la placenta come un organo attraverso il quale le sostanze passano per semplici forze fisiche. La placenta, come

(1) Archives des Sciences Biologiques, St. Petersburg, 1900.
(2) Archiv f. Physiologie, Bd 34, 1884.
(3) V. l. c.

dalle più recenti osservazioni di *Dzierigowski*, *Resinelli* (1) e altri, sembra compiere funzioni più complesse e il suo epitelio è dotato di facoltà speciali ed elettive per l'assorbimento delle sostanze albuminoidi. Da ciò la possibilità che il filtro placentare, come deduce *Dzierigowski* da ricerche sull'immunità artificiale antidifterica, sia permeabile alle albumine e globuline normali, che riceve dal sangue materno e trattenga invece tanto i corpi tossici che antitossici; di conseguenza non penetrino tossine nè antitossine nei feti. Nondimeno avendo *Resinelli* trovato che le lisine del sangue fetale sono minori di quelle materne, sembra probabile che le sostanze materne si trasmettano tutte o solo in parte, ma subendo una notevole riduzione.

Inoltre secondo le nostre attuali cognizioni non si può ammettere che le pareti dei capillari fetali nuotanti nei seni venosi della parte materna della placenta costituiscano una barriera insormontabile ai corpi tossici e antitossici. Il passaggio dell'antitossina materna al feto sostenuta da *Ehrlich* non viene contradetta dal fatto oggi noto che l'immunità contro l'infezione difterica nella discendenza viene ereditata soltanto dalla madre; perchè ciò dipende dalla diminuzione molto rapida dell'immunità dei figli cresciuti immunizzati. Così pure la mancanza di alcuna prova che il feto sia in generale capace di produrre anticorpi, quali antitossine (*Tschistovitsch* e *Jourewitsck*) o idiolisine-agglutinine (*Resinelli*), e l'altro fatto che il siero materno e fetale non contengono anticorpi rispettivamente l'uno per l'altro (*Resinelli*), non escludono l'azione della tossina materna sull'organismo fetale.

Le differenze della resistenza, che abbiamo trovato nei feti durante l'intossicazione difterica nella madre, sembrano basarsi sopra uno speciale meccanismo di distruzione delle sostanze materne nell'organismo fetale piuttosto che nella placenta stessa.

Infatti da un lato risulta che gli anticorpi nella placenta non sono distrutti (*Dzierigowski*) e dall'altro, secondo le nostre esperienze, che la tossina difterica attraverso la placenta arriva a provocare lesioni tossiche anche nei feti; soltanto che questi effetti sul feto non si operano costantemente, nè sempre in modo caratteristico. È quindi assai verosimile che

(1) Sulle proprietà emolitiche e emoagglutinanti del liquido amniotico, Accad. Medica di Ferrara, gennaio, 1902.

l'agente tossico e immunizzante materno eserciti un'azione diretta endouterina sui tessuti e sugli umori del feto; ma che gli anticorpi dell'organismo, rappresentanti secondo la teoria chimica di *Ehrlich* i ricettori staccatisi dalle cellule, si presentino diversamente nella madre e nel feto, e che in quest'ultimo variino a seconda degli stadi di maturazione. Questa teoria spiegherebbe gli esiti diversi dell'influenza della tossina difterica durante i vari periodi della gravidanza, sia rispetto alla vita e alle lesioni della madre che a quelle del feto.

Infatti, secondo *Ehrlich*, nel corso dei processi interni del ricambio è possibile o la comparsa di un anticorpo deviatore, o la mancanza dei ricettori, per scomparsa di un prodotto di ricambio incostante e soltanto temporaneo.

Un esempio appunto di tali modificazioni di affinità chimiche sembra presentato dall'interessante fatto osservato da *Gley*, che, mentre normalmente i globuli rossi del coniglio adulto sono sensibilissimi alla emolisina del siero di anguilla, quelli invece dei conigli neonati sono molto resistenti contro lo stesso veleno e solo nel decorso di settimane raggiungono la normale grande sensibilità.

Un fatto simile risulta pure da altre mie ricerche sulle emolisine specifiche del coniglio, in cui ho potuto constatare che l'estratto di midollo osseo funzionante, rispettivamente gli eritrociti giovani (nucleati) ancora situati in esso, esercitano una azione protettiva contro il potere litico dell'emotossina. Ora, nel ricambio biochimico del feto, è probabile che l'azione della tossina difterica sugli elementi embrionali, rispettivamente sui prestadii dei tessuti adulti, si esplichi in modo diverso nei varii periodi dello sviluppo fetale.

Pel tal modo la tossina difterica circolante nel sangue della madre, dopo avere attraversato la placenta, si fisserebbe ora più ora meno nei tessuti e negli umori fetali, i quali legandola resterebbero variamente influenzati.

L'influenza dunque diversa della tossina difterica nell'organismo della madre e del feto si esercita non solo in quantità, ma anche in qualità; e in questi rapporti tra l'intossicazione materna e quella fetale risiede verosimilmente la ragione principale della maggiore tolleranza per una stessa dose di tossina difterica da parte delle cavie gravide in confronto di quelle non gravide.

Qualora invece la dose tossica mortale introdotta nell'organismo della madre non venisse neutralizzata, parte in esso, parte diffondendosi attraverso la placenta al feto, si dovrebbe verificare l'effetto precisamente opposto, la morte cioè più facile nelle cavie gravide anzichè in quelle non gravide; poichè nel corpo delle gravide, già diminuito della funzione antitossica del fegato, la tossina difterica agendo sopra una quantità minore in grammi di animale, dovrebbe riuscire necessariamente più mortale.
